

(19) 世界知识产权组织
国际局(43) 国际公布日:
2004年5月6日(06.05.2004)

PCT

(10) 国际公布号:
WO 2004/038413 A1

(51) 国际分类号: G01N 33/53, 33/543, 33/68

(21) 国际申请号: PCT/CN2003/000208

(22) 国际申请日: 2003年3月24日(24.03.2003)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:
02137620.4 2002年10月24日(24.10.2002) CN

(71) 申请人(对除美国以外的所有指定国): 上海致康生物科技有限公司(SHANGHAI HEALTHDIGIT CO., LTD.) [CN/CN]; 中国上海市钦州北路1089号51号楼4楼, Shanghai 200233 (CN)。

(72) 发明人;及
(75) 发明人/申请人(仅对美国): 胡赓熙(HU, Gengxi) [CN/CN]; 中国上海市钦州北路1089号51号楼4楼, Shanghai 200233 (CN)。

(74) 代理人: 上海专利商标事务所(SHANGHAI PATENT & TRADEMARK LAW OFFICE); 中国上海市桂平路435号, Shanghai 200233 (CN)。

(81) 指定国(国家): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW

(84) 指定国(地区): ARIPO专利(GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚专利(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 欧洲专利(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI专利(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG)

本国际公布:
— 包括国际检索报告。

所引用双字母代码和其它缩写符号, 请参考刊登在每期PCT公报期刊起始的“代码及缩写符号简要说明”。

(54) Title: A PROTEIN CHIPS DETECTING SYSTEM WHICH CAN SIMULTANEOUSLY DETECT MULTI TARGET

(54) 发明名称: 一种多指标并行检测的蛋白芯片检测系统

(57) Abstract: The present invention provides a protein chips detecting system which can simultaneously detect multi target, and the method for manufacturing the system. The invention increases the stability and sensitivity of the system by improving the present protein chips system and the manufacture.

(57) 摘要

本发明提供了一种多指标并行检测的蛋白芯片检测系统及制备方法。本发明通过对现有蛋白芯片检测系统及制备的改进, 增加了检测系统的稳定性, 提高了检测灵敏度。

一种多指标并行检测的蛋白芯片检测系统

技术领域

本发明涉及生物技术领域，具体涉及一种多指标并行检测的蛋白芯片检测系统
5 及制备方法。

背景技术

生物芯片技术是九十年代中期兴起的一种新型生物学技术，它基于生物大分子
(核酸、蛋白质等)间相互作用的大规模并行分析方法，并结合微电子、微机械、
10 化学、物理、计算机等多领域的技术，将生命科学研究中所涉及的样品反应、检测、
分析等过程连续化、集成化、微型化，已成为当今生命科学研究领域发展最快的技术之一。

生物芯片可以广泛应用于农业、环境、食品、法庭、军事、科研等领域。不仅如此，
由于生物芯片可同时检测多种疾病相关基因或蛋白，从而对遗传病、肿瘤、
15 传染性疾病进行辅助诊断，所以它还具有重要的临床应用价值。

生物芯片主要分为三大类：核酸芯片、蛋白芯片和芯片实验室。

蛋白芯片是检测蛋白质之间相互作用的生物芯片。目前研究中的蛋白芯片技术大多基
于抗原和抗体特异性结合的原理，将多种蛋白质结合在固相基质(如：特殊处理的玻片、
有机膜片、硅微球等)上，检测生物样品所含有的可与之专一性结合的对应蛋白质。

20 蛋白芯片可通过发现体内特定蛋白质的含量变化，准确地对生理/病理变化作出
判断。在临床诊断领域，蛋白芯片具有广阔的应用前景。

本发明人在中国专利 01105023.3 中已公开了一种能同时检测多指标的蛋白芯片
检测系统及制备方法，实现了对一些特异性高但在体液中含量很低蛋白的临床同时
25 检测。

发明内容

本发明所要解决的技术问题，是在原申请 01105023.3 基础上，对蛋白芯片检测
系统加以改进，以增加检测系统的稳定性，提高检测灵敏度。

中国专利申请 01105023.3 中已公开了一种用于多指标并行检测的蛋白芯片检
30 测系统，该检测系统包括：

(1) 用于多指标并行检测的蛋白芯片；

(2) 以一定浓度配比制成的, 并带有发光标记的多蛋白混合液即反应液;

(3) 一系列已知浓度且浓度递增的被测蛋白的混合液即标准品;

(4) 一种蛋白芯片的洗涤液。

5 本发明修改了被测蛋白标准品溶液的配方, 使不同蛋白质混合后不会丧失活性, 增加了其稳定性, 提高了检测的准确性。

所述的已知浓度且浓度递增的被测蛋白 (或称目标蛋白 A) 的标准品溶液配方为 40%-60%胎牛血清+各种高浓度纯化抗原+0.02-0.1%NaN₃ 或 PH7.0-7.8 0.05M PB (KH₂PO₄-Na₂HPO₄) +2-30%BSA+1.5-2.5%蔗糖+0.02-0.1%NaN₃+各种高浓度纯化抗原。该一系列已知浓度且浓度递增的目标蛋白 A 的混合液配制后冻干保存。

10 本发明所要解决的另一技术问题是提供一种改进的上述检测系统中的蛋白芯片的制备方法。

本发明所述蛋白芯片包括固相载体和固定于载体上用于多指标并行检测的蛋白, 该蛋白芯片是利用芯片自动点样系统, 通过物理吸附或共价结合的方式, 将多种蛋白质以一定的排列次序固定在固相载体上; 然后用封闭液将固相载体的非点样部位封闭, 干燥保存。蛋白质可以是抗原、抗体、受体、配体等, 进一步指能与体内疾病性标志蛋白特异结合的蛋白, 尤其是肿瘤标志性蛋白。

其中所述的固相载体可以是无机片基或有机化合物片基, 无机片基包括半导体硅片、玻璃片、微孔硅片、微孔玻璃片等, 优选玻璃片; 有机片基包括醋酸纤维素膜、硝酸纤维素膜, 尼龙膜, 聚丙烯膜等。

20 该蛋白芯片是通过下述技术方案获得的:

1、确定多种不同的被测物蛋白 (简称目标蛋白 A) 和 A 特异性的抗原、抗体或受体等 (简称 B), 如体内疾病标志性蛋白和能与之特异结合的多种蛋白;

2、将上述所述 B 即不同的蛋白探针以一定浓度溶于包被液中, 然后用芯片自动点样系统将这些蛋白质点制在固相载体上, 点样密度 25-200 点/cm², 点样量 0.1-10ng/点;

3、4℃放置过夜;

4、用封闭液将蛋白芯片封闭;

5、干燥处理, 储存于 4℃;

30 为了使芯片上所点的多种蛋白质在发生一系列反应后产生的光信号能在相邻两个数量级上 (最强点/最弱点<100), 以便于检测仪器的检测, 事先调节了芯片上蛋白质的浓度。(最适点样浓度)。

本发明提供的包被液配方为 pH 为 7.0-8.0 的 PB ($\text{KH}_2\text{PO}_4\text{-Na}_2\text{HPO}_4$)。

本发明提供的封闭液配方为：含 1-9%BSA，1-9% 蔗糖，0.01-1% NaN_3 的 PB ($\text{KH}_2\text{PO}_4\text{-Na}_2\text{HPO}_4$)。其优点是：BSA 都有封闭作用，蔗糖是惰性物质，能隔绝空气，BSA 和蔗糖可作为支持框架结构的物质。封闭液的作用使固相载体的其他部位不能结合蛋白质，从而保证实验数据的准确性。

本发明在制备方法中缓冲液配方的改进与原发明相比降低非特异性吸附，减少背景信号值；并增加了蛋白芯片的稳定性，提高了检测的灵敏度。

附图说明

图 1 为本发明改进缓冲液配方的制备方法制备的蛋白芯片信号图象。

图 2 为原发明制备方法制备的蛋白芯片信号图象。

具体实施方式：

在本发明中，所用固体材料（例如 BSA、蔗糖、酪氨酸和 NaN_3 ）的用量用重量百分比表示，所用溶液（例如 Tween 20、胎牛血清和 Proclin 液体）的用量用体积百分比表示。

实施例一、用改良后的缓冲液（包括封闭液、包被液）配方制备肿瘤检测蛋白芯片与以原有缓冲液配方制备的蛋白芯片背景和信号值比较

1、用改进缓冲液配方的蛋白芯片制备方法制备蛋白芯片 E：

1.1 将 AFP、CEA、PSA、free-PSA、CA125、CA15-3 六种肿瘤标志物的对应抗体（一抗）以一定浓度溶于包被液中，然后用芯片自动点样系统将这些蛋白质点制在固相载体上，点样密度 48 点/ cm^2 ，点样量 0.5ng/点，每种一抗对应点 4 个平行点；

1.2 4℃放置过夜；

1.3 用封闭液将蛋白芯片封闭 1 小时；

1.4 干燥处理 2 小时，储存于 4℃备用。

其中用到的包被液配方为 pH 为 7.8 的 PB ($\text{KH}_2\text{PO}_4\text{-Na}_2\text{HPO}_4$)。

其中用到的封闭液配方为：3%BSA，5% 蔗糖，0.5% NaN_3 的 PB ($\text{KH}_2\text{PO}_4\text{-Na}_2\text{HPO}_4$)。

2、用原蛋白芯片制备方法制备蛋白芯片 F

其中用到的包被液配方为 pH 为 9.6 的 CBS ($\text{NaHCO}_3\text{-Na}_2\text{CO}_3$)。

其中用到的封闭液配方为：含 0.2%Tween20，0.1%酪氨酸，5%BSA，4%蔗糖，

0.5%proclin 的 TBS。

将上述蛋白芯片 E、F 与配套的反应液、洗液、和已知浓度的血清样品反应，(剩余的血清样品留待下一次实验使用)。并用生物芯片检测仪进行拍摄和数据分析。信号值如表 1 所示：

5 表 1

	芯片 E	芯片 F
AFP	925	1035
CEA	2995	2906
PSA	2170	2201
Free-PSA	2017	1978
CA125	913	879
CA153	1082	1033

将上述芯片 4℃ 贮存放置，6 个月后与取上述实验中同一批号地反应液、洗液、和上述的剩余血清样品反应，信号值如表 2 所示：

表 2

	芯片 E	芯片 F
AFP	875	477
CEA	2630	1486
PSA	2140	864
Free-PSA	1087	671
CA125	906	311
CA153	972	557

10

与蛋白芯片 F 相比，按本发明的缓冲液配方制备的蛋白芯片 E 其稳定性明显增加。

另外，由生物芯片拍摄出的蛋白芯片 E 信号图象见图 1，蛋白芯片 F 信号图象见图 2。由两图可见，图 1 的背景明显低于图 2。

15 实施例二、用改良后的标准品缓冲液配方制备标准品与原有标准品稳定性比较

1. 以如下配方配制标准品缓冲液：60%胎牛血清+各种高浓度纯化抗原

+0.05%NaN₃,另加入 60 μl AFP, CEA, NSE 高浓度纯化抗原制成标准品溶液 A;

2. 以如下配方配制标准品缓冲液: PH7.8 0.05M PB (KH₂PO₄-Na₂HPO₄)+15%BSA+2.5%蔗糖+0.05%NaN₃,另加入 60 μl AFP, CEA, NSE 高浓度纯化抗原制成标准品溶液 B;

- 5 3. 按原有配方配制标准品缓冲液, 另加入 60 μl AFP, CEA, NSE 高浓度纯化抗原制成标准品溶液 C。

注: 溶液 A、B、C 中的 AFP、CEA、NSE 终浓度是一致的。

将以上三种标准品溶液冻干, 分别是标准品 a、b 和 c, 用化学发光自动分析仪进行标定, 标定的浓度值结果如表 3:

表 3

肿瘤标志物	单位	标准品 a	标准品 b	标准品 c
AFP	ng/ml	728	709	711
NSE	ng/ml	1862	1830	1875
CEA	ng/ml	1161	1163	1172

将 a、b、c 三种标准品贮存于 4℃, 放置 3 个月后, 用同一台化学发光自动分析仪进行复标, 标定的浓度值结果如表 4:

表 4

肿瘤标志物	单位	标准品 a	标准品 b	标准品 c
AFP	ng/ml	731	705	352
NSE	ng/ml	1799	1803	1007
CEA	ng/ml	1095	1168	409

与原有缓冲体系制备的标准品 c 相比, 标准品 a、b 的浓度更为稳定, 可保存更长的时间不丧失活性。

权利要求

1. 一种多指标并行检测的蛋白芯片检测系统, 由用于多指标并行检测的蛋白芯片、以一定浓度配比制成的, 并带有发光标记的多蛋白混合液即反应液、一系列已知浓度且浓度递增的被测蛋白的混合液即标准品、和洗涤液组成, 其特征在于其中所述的标准品溶液配方为: 40%-60%胎牛血清+各种高浓度纯化抗原+0.02-0.1% NaN_3 或 pH7.0-7.8 0.05M PB (KH_2PO_4 - Na_2HPO_4)+2-30%BSA+1.5-2.5%蔗糖+0.02-0.1% NaN_3 +各种高浓度纯化抗原。

2. 一种如权利要求 1 所述的蛋白芯片检测系统的制备方法, 其中蛋白芯片制备包括下列步骤:

1) 确定多种不同的被测物蛋白 (简称目标蛋白 A) 和 A 特异性的抗原、抗体或受体等 (简称 B), 如体内疾病标志性蛋白和能与之特异结合的多种蛋白;

2) 将上述所述 B 即不同的蛋白探针以一定浓度溶于包被液中, 然后用芯片自动点样系统将这些蛋白质点制在固相载体上, 点样密度 25-200 点/ cm^2 , 点样量 0.1-10ng/点;

3) 4℃放置过夜;

4) 用封闭液将蛋白芯片封闭;

5) 干燥处理, 储存于 4℃;

其特征在于其中所述的包被液配方为: pH 为 7.0-8.0 的 PB (KH_2PO_4 - Na_2HPO_4)。

3. 一种如权利要求 2 所述的蛋白芯片检测系统的制备方法; 其特征在于其中所述的封闭液配方为: 含 1-9%BSA, 1-9% 蔗糖, 0.01-1% NaN_3 的 PB (KH_2PO_4 - Na_2HPO_4)。

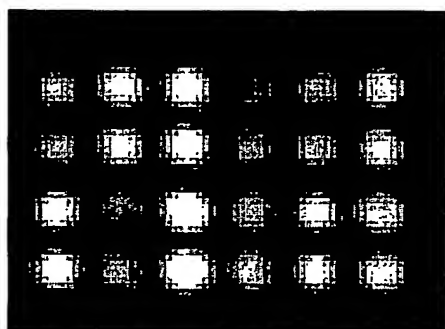


图 1

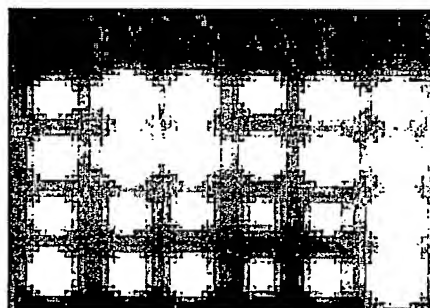


图 2

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN03/00208

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC⁷ G01N33/53,G01N33/543,G01N33/68

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC⁷ G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

PATENT DOCUMENTATION OF CHINA (1985~)

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPODOC,WPI,PAJ,CNPAT protein chip+

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CN1363840A(SHANGHAI HEALTHDIGIT CO., LTD.) 14 August 2002(14.08.2002) The whole document	1-3
A	WO01/14425A1(DIACHIP LIMITED et al) 1 March 2001(01.03.2001) The whole document	1-3
A	CN1338634A(SHANGHAI JINGTAI BIO LTD) 6 March 2002(06.03.2002)	1-3

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim (S) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
18.June.2003(18.06.03)

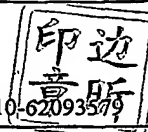
Date of mailing of the international search report

10 JUL 2003 (10.07.03)

Name and mailing address of the ISA/CN
6 Xitucheng Rd., Jimen Bridge, Haidian District,
100088 Beijing, China
Facsimile No. 86-10-62019451

Authorized officer

Telephone No. 86-10-62093579



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN03/00208

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>The whole document</p> <p>Analytical Biochemistry No.278 2000 , Pavel Arenkow, et al</p> <p>Protein microchips:Use for Immunoassay and Enzymatic Reactions</p> <p>Page123-131</p>	1-3

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN03/00208

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
CN1363840A	14-8-2002	NO	
WO01/14425A1	01-03-2001	AU673500A	19-03-2001
CN1338634A	06-03-2002	NO	

国际检索报告

国际申请号

PCT / CN03 / 00208

A. 主题的分类

IPC⁷ G01N33/53,G01N33/543,G01N33/68

按照国际专利分类表(IPC)或者同时按照国家分类和 IPC 两种分类

B. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类体系和分类号)

IPC⁷ G01N

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

中国专利文献(1985~)

在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称和, 如果实际可行的, 使用的检索词)

EPODOC,WPI,PAJ,CNPAT protein chip+

C. 相关文件

类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求编号
A	CN1363840A (上海数康生物科技有限公司) 2002 年 8 月 14 日 (14.08.02) 全文	1-3
A	WO01 / 14425A1 (DIACHIP LIMITED et al) 2001 年 3 月 1 日 (01.03.01) 全文	1-3
A	CN1338634A (上海晶泰生物技术有限公司) 2002 年 3 月 6 日 (06.03.02) 全文	1-3

☒ 其余文件在 C 栏的续页中列出。

☒ 见同族专利附件。

* 引用文件的专用类型:

“A” 明确叙述了被认为不是特别相关的一般现有技术的文件
“B” 在国际申请日的当天或之后公布的在先的申请或专利
“L” 可能引起对优先权要求的怀疑的文件, 为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件
“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件
“P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件

“T” 在申请日或优先权日之后公布的在后文件, 它与申请不相抵触, 但是引用它是为了理解构成发明基础的理论或原理
“X” 特别相关的文件, 仅仅考虑该文件, 权利要求所记载的发明就不能认为是新颖的或不能认为是有创造性
“Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 权利要求记载的发明不具有创造性
“&” 同族专利成员的文件

国际检索实际完成的日期
18.6 月 2003 (18.06.03)

国际检索报告邮寄日期
10. 7 月 2003 (10.07.03)

国际检索单位名称和邮寄地址
ISA/CN
中国北京市海淀区西土城路 6 号(100088)

授权官员
印边章昕
电话号码: 86-10-62093579

传真号: 86-10-62019451

C(续). 相关文件		
类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求编号
A	Analytical Biochemistry, 278 期, 2000 年, Pavel Arenkow ,et al Protein microchips: Use for Immunoassay and Enzymatic Reactions,- 123-131 页	1-3

国际检索报告
关于同族专利成员的情报

国际申请号
PCT/CN03/00208

检索报告中引用的 专利文件	公布日期	同族专利成员	公布日期
CN1363840A	14-8-2002	无	
WO01/14425A1	01-03-2001	AU6735600A	19-03-2001
CN1338634A	06-03-2002	无	